

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-154696

⑤Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	④公開 昭和63年(1988)6月27日
C 07 H 21/04		7138-4C	
C 12 P 19/34		8515-4B	
// C 12 N 15/00		A-8412-4B	
C 12 Q 1/68		A-8412-4B	
G 01 N 33/50		P-8305-2G	審査請求 未請求 発明の数 2 (全17頁)

④発明の名称 生体試料から核酸を単離し精製する方法

②特 願 昭62-304407

②出 願 昭62(1987)12月1日

優先権主張 ②1986年12月1日③米国(US)④936,163

⑦発明者 デビッド ビー. セリ アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53213 ワウワト  
グゾン サ, エイトナ コート 6830

⑦発明者 エルジー ジェイ. シ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92130 サンディエ  
ユラウダー ゴ, カミニト デル マー サーフ 3947

⑦出願人 モレキュラー バイオ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サンディエ  
システムズ インコー ゴ, バーネス キヤニヨン ロード 10030  
ポレイテッド

⑦代理人 弁理士 山本 秀策

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

生体試料から核酸を単離し精製する方法

## 2. 特許請求の範囲

1. タンパク、色素、カルボキシル化ムコ多糖類、硫酸エステル化ムコ多糖類、およびこれらの混合物でなる群から選択された水溶性夾雑成分と共に、核酸を含有する生体試料の水溶液から核酸を単離し精製する方法であって、

(a) 目的の核酸が溶離するモル濃度よりも低い塩化物のモル濃度で該目的の核酸を有効に結合する陰イオン交換体カラム材料を選択すること；

(b) 該核酸が結合するような、上記の選択された陰イオン交換体材料であり、陰イオン基が塩化物の形である陰イオン交換体材料を充填したカラムに該試料を注入すること；

(c) 該核酸が該カラム材料に結合し続ける塩化物モル濃度であり、該核酸が溶離し始める最低の塩化物モル濃度に接近した洗浄液濃度の塩化物水溶液によって、カルボキシル化ムコ多糖類を含む

非結合成分を該カラムから洗い流すのに十分な容量で該カラムを洗浄すること；

(d) 該目的の核酸が完全に溶離する最低の塩化物モル濃度に対応する溶離塩化物モル濃度を有する塩化物の水溶液を、該カラムから該核酸を取り出すのに十分な容量で該カラムに通過させることによって、該結合した核酸を溶離させる一方で、硫酸エステル化されたムコ多糖類を含む夾雑成分を該カラム中に残留させること；および

(e) ムコ多糖類および他の夾雑成分を実質的に含有せずに溶離された核酸を回収すること、を包含する方法。

2. 前記核酸が、一本鎖のDNA およびRNA、そして二本鎖のDNA およびRNA でなる群から選択される、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 前記核酸が、細胞またはウイルスの起源に由来する、特許請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

4. 前記試料が、病原体の検査を必要とする体液または排泄物から調製される、特許請求の範囲

第1項から第3項までのいずれかに記載の方法。

5. 前記試料が、糞便、血液、尿、または唾液から調製される、特許請求の範囲第4項に記載の方法。

6. 前記陰イオン交換体材料が、交換部位として第3アミン基を有する、特許請求の範囲第1項から第5項までのいずれかに記載の方法。

7. 前記陰イオン交換体材料が、交換部位として第4アンモニウム基を有する、特許請求の範囲第1項から第5項までのいずれかに記載の方法。

8. 前記洗浄溶液および溶離溶液が、重力による流れによって前記カラムを通過する、特許請求の範囲第1項から第7項までのいずれかに記載の方法。

9. 前記洗浄溶液および溶離溶液が、塩化ナトリウムの溶液である、特許請求の範囲第1項から第8項までのいずれかに記載の方法。

10. 溶解した細胞またはウイルスの水溶性夾雑成分であり、タンパク、色素、カルボキシ化ムコ多糖類、硫酸エステル化ムコ多糖類、およびこ

れらの混合物でなる群から選択された水溶性夾雑成分と共に、核酸を含有する水溶液試料から、細胞またはウイルスの核酸を単離し精製する方法であって、

(a) 目的の核酸が溶離するモル濃度よりも低い塩化物モル濃度の水溶液で該目的の核酸を有効に結合する弱塩基陰イオン交換体を含む第1のイオン交換体カラム材料を選択すること；

(b) 該目的の核酸が溶離するモル濃度よりも低い水性塩化物モル濃度であり、該第1のカラム材料の溶離モル濃度に対応する結合モル濃度で該目的の核酸を有効に結合する強塩基陰イオン交換体を含む第2のイオン交換体カラム材料を選択すること；

(c) 塩化物の形の該第1のカラム材料および該第2のカラム材料をそれぞれ充填した第1のカラムおよび第2のカラムを、分離カラムまたは堆積カラムのどちらかとして調製すること；

(d) 該目的の核酸が該第1のカラム材料に結合する該第1のカラムであり、該弱塩基交換体を含

3

む該第1のカラムに該試料を注入すること；

(e) 該核酸が該第1のカラム材料に結合し続ける塩化物モル濃度であり、該核酸が溶離し始める塩化物モル濃度に接近した洗浄液モル濃度の塩化物水溶液によって、カルボキシ化ムコ多糖類を含む非結合成分を該第1のカラムから洗い流すのに十分な容量で該第1のカラムを洗浄すること；

(f) 該目的の核酸が溶出し始める最低の塩化物モル濃度に対応する溶離塩化物モル濃度を有する塩化物の水溶液を、該第1のカラムから該核酸を取り出すのに十分な容量で該第1のカラムに通過させることによって、該結合した核酸を溶離させる一方で、硫酸エステル化されたムコ多糖類を該第1のカラム中に残留させること；

(g) 該第1のカラム材料から溶離された該核酸を含む該第1のカラムの溶出液を、該核酸が結合する該第2のカラム材料を含む該第2のカラムに通過させること；

(h) 該核酸が該第2の材料から完全に溶離する最低の塩化物モル濃度に対応し、該第1のカラム

4

の溶離液よりも高い溶離塩化物モル濃度を有する塩化物の水溶液を、該第2のカラムから該核酸を取り出すのに十分な容量で該第2のカラムに通過させることによって、該結合した核酸を溶離させること；および

(i) ムコ多糖類および他の夾雑成分を実質的に含有せずに単離され精製された核酸を回収すること、

を包含する方法。

11. 前記カラムの両方が重力による流れによって操作され、前記工程(d)の洗浄が前記第2のカラムについて行われる、特許請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 前記ムコ多糖類がカルボキシ化ムコ多糖類および硫酸エステル化ムコ多糖類の両方を含み、該カルボキシ化ムコ多糖類が前記カラムの両方から洗い流され、そして前記核酸が前記第2のカラムから取り出された後も該硫酸エステル化ムコ多糖類が前記第1のカラムまたは該第2のカラムのいずれかに残留している、特許請求の範囲第10

5

6

項または第11項に記載の方法。

13. 前記試料が、糞便、血液、尿、および唾液でなる群から選択された体液または排泄物から調製される、特許請求の範囲第10項から第12項までのいずれかに記載の方法。

14. 前記第1の材料が陰イオン交換部位として第3アミン基を有し、前記第2の材料が陰イオン交換部位として第4アンモニウム基を有する、特許請求の範囲第10項から第13項までのいずれかに記載の方法。

15. 前記核酸が、一本鎖のDNA およびRNA、そして二本鎖のDNA およびRNA でなる群から選択される、特許請求の範囲第10項から第14項までのいずれかに記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明の利用分野は、生体試料からの核酸、DNA および/またはRNA の迅速な分離、単離および精製に関する。この方法は特に、核酸ハイブリダイゼーション技術を用いる臨床的診断のための、体

液または組織からの核酸の迅速かつ簡便な精製に関する。

(従来の技術)

生体試料からDNA またはRNA を単離する方法がいくつか公表されている。細菌のDNA 単離の最も初期の方法の1つは、アルキルトリメチルアンモニウムブロミドとの沈澱を利用している。Jones, *Biochim. Biophys. Acta* (1953) 10 : 607-612, および Jones, *Nature* (1963), 199 : 280-282を参照のこと。Jones の方法では、アルキルトリメチルアンモニウムブロミドは他の成分をも沈澱させる。この塩を完全に除去しなければならず、精製DNA を得るのにその後の一連の抽出と沈澱が必要であり、この操作に1~2日かかる。複雑な生体試料は用いられなかった。

微生物からのDNA 単離の後期の方法は、最初に Marmur, *J. Mol. Biol.* (1961) 3 : 208-218に記載された。Marmurの方法もまた苛性試薬、フェノールおよびクロロホルムを用いる一連の抽出と沈澱を包含する。MarmurおよびJones のどちらの方

法もエタノールを沈澱試薬として用いる。Marmurの方法はまだ当該分野で位置をしめていると考えられているが、実施に1~2日間を要する。どちらの方法も有害な有機溶媒を用い、この有機溶媒はこれらの方法を臨床的に受け入れられないものとしている。

尿または血液のようないくつかの体液からの、直接溶解およびスポッティングのような、他の直接的かつ迅速な調製法が公知である。例えば、GillespieのようなHPLC用の強陰イオン交換体を用いる方法から、*BioTechniques* Nov./Dec. 174-192(1983)およびBarkerら、*Science* 231 : 1434-1436(1986)を参照のこと。また *Nucleic Acid Hybridization : A Practical Approach*, B. HanesおよびS. Higgins 編, IRL Press, Washington (1985)に記載の一般技術も参照のこと。しかし、著者ら自身が議論しているように、この方法は臨床的に適切なサンプル量では直接使用できず、これら比較的単純なサンプルでさえ、許容されない核酸以外の成分の干渉がある。

これらの抽出/沈澱精製法に加えて、いくつか

の特別に設計されたカラム充填材を用いたクロマトグラフカラム分離法が提案されている。すなわち、DuPont NEN Products, Boston, MA, により市販されており主として逆相吸着による機能があり生体試料には勧められない“NENSORB 20”カートリッジ, Machery-Nagel, Duren, West Germany から市販されているHPLC用のDEAE弱陰イオン交換体“NUCLEOGEN”, および Whatman Partisil SAX の特別な設計されたカラム充填材を用いたクロマトグラフカラム分離法が提案されている。しかし、これまでに用いられたクロマトグラフカラム系は、十分な分離を得るためには長く、高圧を要するHPLC装置を必要とし、糞便、血液、または他の体液もしくは組織から調製されるような核酸以外の多くの成分を含む複雑な生体試料からの核酸の単離は不可能であった。このような試料をこれらのカラム系に添加すると、カラムの避けることのできない劣化、分解損失および閉塞を引き起こす。そこで、核酸の十分な単離についてこれらの系を実用化するためには、試料の前処理がかなり必要であり、そして機械的背

圧には精巧なポンプの作動と供給系の使用が必要である。

DNA / RNA 単離の技術の現状は、Marmurにより記載された20年前の方法の変法が引続き利用されている。この方法は多くの単調で時間のかかるステップを要し、受け入れ難い有機溶媒での多数の処理を必要とし、そして臨床研究室でのハイブリダイゼーション分析に必要な十分に単離された核酸を提供しない。生体試料中の夾雑物は、DNA / RNA ハイブリダイゼーションの固定および検出を妨害する。結論として、有用な臨床のハイブリダイゼーション分析を提供するために、生体試料からハイブリダイゼーション核酸を得るための迅速法が必要とされる。現在、このような系は存在しない。このような方法は以下のものであるべきである：(1)迅速…時間または日ではなく分；(2)効果的…ハイブリダイゼーションを検出するのに十分なRNA またはDNA を回収可能；(3)試料の前処理が殆どいらぬかまたは不要；(4)高価な装置またはポンプは不必要；(5)有機溶媒または過激な条件を

用いない；(6)本質的に自然界で万能…RNA またはDNA のどのような長さにも、一本鎖または二本鎖にも用いることが可能；および(7)高い純度のDNA またはRNA が得られる。このように、生体材料から夾雑物のバックグラウンドを除去すべきである。本発明は、試料の迅速な溶解と、それに続く簡便化した陰イオン交換分離による夾雑物が多い生体試料に含まれる核酸の単離とを組み合わせた新規な方法を用い、これらの要求を満たしている。

試料中に存在する硫酸塩エステル化ムコ多糖類からDNA を分離する電気泳動により、アガロースゲルからDNA を回収し得る実験室操作法が知られている。この方法は、一般にムコ多糖類が試料からDNA と共に抽出されることを容認しており、この特別な電気泳動法をこれら成分の分離に用いる。電気泳動によるDNA とムコ多糖類との分離に引続き、DNA 画分を切り出し、電気的に溶出する。ゲル内容物をさらに精製するために、“DEAE-Sephacel”に溶出物を通すことが提案されている。この方法では、カラムに添加したDNA を 0.3M NaCl水溶液

1 1

で洗浄し、その後 0.6M NaCl水溶液でDNA を溶出する。この溶出液をフェノールで2回、フェノール/クロロホルムで1回、そしてクロロホルムで1回抽出する。次いでDNA を精製された溶出液からエタノール沈澱により回収する。Maniatisら、“Molecular Cloning” (1982) 164-166 頁を参照のこと。上述の操作は所望のDNA からムコ多糖類を分離するが、この方法は労力を要する方法である。この方法は電気泳動溶出、カラム分離、そしてフェノール-クロロホルム抽出を包含する。  
(発明の要旨)

本発明の方法は、生体試料からのDNA またはRNA の迅速分離、単離および精製に適用し得る。このDNA / RNA は二本鎖または一本鎖の形でよい。この方法は細菌、ウイルスおよび哺乳類細胞の遺伝子DNA またはRNA の分析、および大便、痰、尿および血液試料を包含するヒト体液および組織試料を用いるのに特に有利である。

このような生体試料は、酸性ムコ多糖類、および上述の従来法では DNA / RNA からの分離が特に

1 2

困難である夾雑した妨害分子を含有している。酸性ムコ多糖類は規則正しく配置された糖および負電荷を有するポリマーであり、従って核酸に非常に似ている。病原微生物（細菌またはウイルス）由来の DNA / RNA を検査する必要のある臨床試料には、カルボキシル化および/または硫酸エステル化ムコ多糖類が存在し、ハイブリダイゼーション分析に高いバックグラウンドを生ずることが知られている。これらのムコ多糖類は膜への結合について望ましくない様式で DNA / RNA と拮抗し、そのためハイブリダイゼーションの結果を減じる。DNA または RNA を妨害成分、特にタンパク、生物色素、およびヒアルロン酸、コンドロイチン、デルマタン、ヘパリン、およびケラチンなどのムコ多糖類から効果的に分離し得ることは、本発明の重要な特徴である。

病原体の臨床的同定には、DNA / RNA を細菌/ウイルスを含有する体液、組織、または排泄物から回収することが望まれる。このような試料は、例えば、糞便、尿、血液、痰および傷からの浸出

1 3

1 4

液から得られる。これらの試料は全て、水溶性成分でかなり汚染されている。大便試料は、ムコ多糖類に加えて胆汁色素や他の物質を含有しており、これらをハイブリダイゼーション分析の前にDNA/RNAから除去しなければ、望ましくない蛍光や吸収のバックグラウンド効果を生じ得る。本発明のさらに重要な特徴は、このような妨害物質を分析されるべきDNA/RNAから容易に分離し得ることである。

本発明の方法は、市販されている陰イオン交換体を利用し得る。強陰イオン交換体または弱陰イオン交換体は、どちらも水溶液で使用し得る。選択された溶液を吸着および溶出に用いることにより、核酸（DNAまたはRNA）を精製、濃縮、および十分に単離し得る。

核酸を陰イオン交換のカラム充填剤へ最初に結合するのに既知のイオン強度の溶液を用いることにより、タンパク（比較的弱い結合の夾雑物）のような他の電気的に陰性の分子を含む大部分の水溶性成分をカラムから洗い出し得る。溶出のため

に、必要なイオン強度がNaClのような既知の塩により調製され、pH強度を制御するために緩衝液と混合される。このイオン強度は、理想的には核酸が完全に溶出される最低限のイオン強度に相当する。核酸と同じ条件下で吸着される夾雑物質は、これによりカラム内に停まる。つまり、より強く結合した夾雑物が核酸と分離される。

ある一つの好ましい実施態様では、2つのカラム（またはカラム区分）がDNAまたはRNAの分離に用いられる。異なった陰イオン交換体の2つのベッドが用いられる。流出方向の最初のベッドは弱陰イオン交換体であり、2番目のベッドは強陰イオン交換体である。好ましい弱陰イオン交換体は1級、2級、または3級アミン基（つまりプロトン化できるアミン類）の1つであり、交換基を提供する。強塩基性陰イオン交換体は、4級アンモニウム基（つまり、プロトン化できず常に正に荷電している）を交換基として有している。DNAまたはRNAを分離するために、両方の交換体は、それぞれの吸着および溶出のイオン強度および／

1 5

またはpHに関して選択される。溶液の強度は、結合の強度よりも高い。

別々のカラム、または1つのカラムにベッドを積み重ねて配置してある2ベッド系では、最初のベッドの溶出条件が第2ベッドの効果的な結合条件でなければならない。この条件は、全ての核酸を最初のベッドから溶出し得る最低のイオン強度が、十分に全ての核酸を第2のベッドに結合させるイオン強度および／またはpHであるように、関連づけられ得る。

核酸の全てが十分に溶出される最低のイオン強度に溶離液の条件を限定することにより、ムコ多糖類のようなより強く結合する夾雑成分をベッド内に残し得る。2ベッド系では、第1のベッドに結合されない成分を洗い出すのに用いられる洗浄液を、第2のベッドに流し得る。このことは、第1のベッドで固定されない核酸のいずれもが、第2のベッドに結合されることを確実にする。

本発明の方法の好ましい実施態様では、核酸は、カルボキシル化および／または硫酸エステル化ム

1 6

コ多糖類を含有する溶解した細胞またはウイルスの水溶性成分と共に、該核酸を含む水溶液試料として単離および精製される。イオン交換のカラム材料は、目的の核酸が該カラムから溶出されるモル濃度より低いモル濃度の塩で、2本鎖DNAのような目的の核酸を効果的に結合するものを選ぶ。調製した試料を、カラム材料の陰イオン基が塩化物または他の陰イオン型である、選択された陰イオン交換体を詰めたカラムに添加する。核酸をカラム材料に結合させ、次いで該核酸がカラム材料に結合して残るような塩化物モル濃度の塩化物塩水溶液で該カラムを洗浄する。

特に、酸性ムコ多糖類からのDNA分離を包含する本発明の精製の結果を達成するために、最初の洗浄のモル濃度は、核酸が溶出し始める最低の塩化物モル濃度に近いべきである。次いで、特にカルボキシル化ムコ多糖類を含む非結合成分をカラムから洗い出すために、この洗浄を十分な量で行う。次いで結合した核酸を、核酸が完全に溶出される最低の塩化物モル濃度に相当する溶離用塩化

1 7

1 8

物モル濃度を有する、塩化物塩の水溶液をカラムに流して溶出させる。この溶離液を、硫酸エステル化ムコ多糖類や他の妨害物質をカラム内に残しつつ、核酸をカラムから遊離させるのに十分な容量で流す。次いで溶出された核酸を、カルボキシル化型および硫酸エステル化型の両方の種類のムコ多糖類、タンパク、および他の妨害分子と本質的に遊離した状態で回収する。これは、これまで陰イオン交換体を充填したクロマトグラフカラムを用いることにより達成されなかった、新しくそして予期されなかった結果である。

カルボキシル化ムコ多糖類をカラムを通過させながら、同時に核酸および硫酸エステル化ムコ多糖類を選択的に固定できる塩化物のモル濃度が存在することは、これ迄知られていなかった。硫酸エステル化ムコ多糖類をカラムに残しながら、結合した核酸をカラムから溶出できる塩化物のモル濃度が存在することも知られていなかった。このような分別モル濃度の実用性の発見は、本発明の重要な部分である。

19

る塩化物の水溶液を、該カラムから該核酸を取り出すのに十分な容量で該カラムに通過させることによって、該結合した核酸を溶離させる一方で、硫酸エステル化されたムコ多糖類を含む夾雑成分を該カラム中に残留させること；および

(e)ムコ多糖類および他の夾雑成分を実質的に含有せずに溶離された核酸を回収すること、を包含する。

溶解した細胞またはウイルスの水溶性夾雑成分であり、タンパク、色素、カルボキシル化ムコ多糖類、硫酸エステル化ムコ多糖類、およびこれらの混合物でなる群から選択された水溶性夾雑成分と共に、核酸を含有する水溶液試料から、細胞またはウイルスの核酸を単離し精製する本発明の方法は、

(a)目的の核酸が溶離するモル濃度よりも低い塩化物モル濃度の水溶液で該目的の核酸を有効に結合する弱塩基陰イオン交換体を含む第1のイオン交換体カラム材料を選択すること；

(b)該目的の核酸が溶離するモル濃度よりも低

タンパク、色素、カルボキシル化ムコ多糖類、硫酸エステル化ムコ多糖類、およびこれらの混合物でなる群から選択された水溶性夾雑成分と共に、核酸を含有する生体試料の水溶液から核酸を単離し精製する本発明の方法は、

(a)目的の核酸が溶離するモル濃度よりも低い塩化物のモル濃度で該目的の核酸を有効に結合する陰イオン交換体カラム材料を選択すること；

(b)該核酸が結合するような、上記の選択された陰イオン交換体材料であり、陰イオン基が塩化物の形である陰イオン交換体材料を充填したカラムに該試料を注入すること；

(c)該核酸が該カラム材料に結合し続ける塩化物モル濃度であり、該核酸が溶離し始める最低の塩化物モル濃度に接近した洗浄液濃度の塩化物水溶液によって、カルボキシル化ムコ多糖類を含む非結合成分を該カラムから洗い流すのに十分な容量で該カラムを洗浄すること；

(d)該目的の核酸が完全に溶離する最低の塩化物モル濃度に対応する溶離塩化物モル濃度を有する

20

い水性塩化物モル濃度であり、該第1のカラム材料の溶離モル濃度に対応する結合モル濃度で該目的の核酸を有効に結合する強塩基陰イオン交換体を含む第2のイオン交換体カラム材料を選択すること；

(c)塩化物の形の該第1のカラム材料および該第2のカラム材料をそれぞれ充填した第1のカラムおよび第2のカラムを、分離カラムまたは堆積カラムのどちらかとして調製すること；

(d)該目的の核酸が該第1のカラム材料に結合する該第1のカラムであり、該弱塩基交換体を含む該第1のカラムに該試料を注入すること；

(e)該核酸が該第1のカラム材料に結合し続ける塩化物モル濃度であり、該核酸が溶離し始める塩化物モル濃度に接近した洗浄液モル濃度の塩化物水溶液によって、カルボキシル化ムコ多糖類を含む非結合成分を該第1のカラムから洗い流すのに十分な容量で該第1のカラムを洗浄すること；

(f)該目的の核酸が溶出し始める最低の塩化物モル濃度に対応する溶離塩化物モル濃度を有する

22

21

塩化物の水溶液を、該第1のカラムから該核酸を取り出すのに十分な容量で該第1のカラムに通過させることによって、該結合した核酸を溶離させる一方で、硫酸エステル化されたムコ多糖類を該第1のカラム中に残留させること；

(d) 該第1のカラム材料から溶離された該核酸を含む該第1のカラムの溶出液を、該核酸が結合する該第2のカラム材料を含む該第2のカラムに通過させること；

(e) 該核酸が該第2の材料から完全に溶離する最低の塩化物モル濃度に対応し、該第1のカラムの溶離液よりも高い溶離塩化物モル濃度を有する塩化物の水溶液を、該第2のカラムから該核酸を取り出すのに十分な容量で該第2のカラムに通過させることによって、該結合した核酸を溶離させること；および

(f) ムコ多糖類および他の夾雑成分を実質的に含有せずに単離され精製された核酸を回収すること、

を包含する。

2 3

ラスは被覆され得、それには例えば、“グリコフェーズ”被覆物、グリセロールガラスなどがある。3級アミン基は、通常、DEAE交換体と呼ばれるジエチルアミノエチル基である。他の3級アミン基も採用され得る。1級アミン基は、通常、アミノエチル型であるが、他の1級または2級アミングループも存在し得る。強塩基陰イオン交換体は、被覆されていない、またはグリコフェーズ被覆が施されたシリカガラスのマトリックスを基本として、もしくは、アガロースを基本として供給される。4級基は通常、ジエチルメチルアンモニウムまたはトリメチルアンモニウムであり、それぞれ“QAE”または“QMA”交換体と呼ばれる。

本発明の好適な実施態様においては、塩化物形の陰イオン交換カラム材料が用いられ、そして試料をカラムにかけること、洗浄すること、および核酸を溶出することのために、選択された臨界モル濃度の塩化物が用いられる。好ましい塩化物は塩化ナトリウムであるが、塩化物の陽イオンは変えることができる。つまり、塩化ナトリウムの代

2 5

(発明の構成)

本発明の実施に必要な原材料は、市販の陰イオン交換カラム材料、塩、およびpHを制御するための適当な緩衝液である。カラム吸着材には、4級アンモニウム型の強塩基イオン交換体、アミン型弱塩基陰イオン交換体が包含される。弱塩基陰イオン交換体は、1級アミン交換部位を有するものも用いることができるが、3級アミン交換部位を有するものが好適である。そのような陰イオン交換体は、半多孔体として、一般にはクロマトグラフィークラムで用いられるサイズの球状または不規則な粒状で、供給される。適当な粒子径は約20  $\mu\text{m}$  から 200  $\mu\text{m}$  の範囲であり得る。有効な孔径は、目的とする DNA/RNA および混入物のサイズに依存し、約50Åから数千Åの範囲である。市販材料は、Bio-Rad Chemical, Pierce Chemical Company, Toyo Soda Mfg. Co., および Pharmacia Fine Chemicals を含む数社から得られる。弱塩基交換体は、アガロース、シリカガラス、ビニルポリマーなどを含むマトリックスを基本として有し得る。シリカガ

2 4

わりに塩化アンモニウムおよび塩化カリウムのような他のアルカリ金属塩化物を使用することができる。好ましくはないが、その陽イオンにはまた、アンモニウムイオン、または2価イオン（例えばマグネシウム）も含まれ得る。選択された弱塩基および/または強塩基交換体の分別結合および溶出の塩化物モル濃度は、試験される試料（目的とする核酸を含む）の DNA または RNA の分子型に相当する、純粋の DNA または RNA の試験物質を用いて決定され得る。選択された陰イオン交換体のそれぞれの結合および溶出のモル濃度を決定するには、標準的なクロマトグラフィークラム法が採用され得、試験物質の吸着と溶出とが検出される。例えば、

DNA または RNA は、それらがカラムから出るときに溶液を連続的にモニターできるように、および/または溶出濃度を分光光学的に追跡し得るように、適当なマーカーで標識され得る。

典型的には、調べられるべき特異的目標 DNA または RNA の純水溶液（50 mg / ml ~ 250 mg / ml）は、十分に結合することが確かな充分低い既知量が、

2 6

塩の形で実験カラムにかけられる。次に、拮抗する塩の濃度を段階的にまたは勾配をつけて上げることにより、核酸が溶出し始める。そしてそれらが最大に回収されるモル濃度の範囲が見出される。次に、測定の感度を上げ、そして容量／回収測定が行われる。溶出開始と完全回収との間のモル濃度範囲が狭いマトリックスを使うことが有利である。

本法は自然流出カラムを使用することが有効であり、このカラム操作の方法が単純であるため好ましい。

結合および溶出の塩化物モル濃度は、代表的な市販陰イオン交換体では、DNAおよびRNA試験材料および塩化ナトリウム水溶液を用いて決定されている。本発明の方法のこれら陰イオン交換体を用いての実施に使うことができる分別モル濃度は次の表に要約される。

(以下余白)



DNAおよびRNA試料を用いた場合の市販陰イオン交換体の結合および溶出の代表的なNaClモル濃度

商品名	陰イオン基	マトリックスの基	結合(洗浄) NaCl/溶出NaCl		
			dsDNA <sup>5</sup>	ssRNA <sup>6</sup>	dsRNA <sup>7</sup>
Affi-Gel 102 <sup>1</sup>	1級アミン	アガロース	0.3M/0.5-0.6M		
DEAE Glycophase <sup>2</sup>	3級アミン	シリカガラス	0.2M/0.6M		
Fractogel TSK DEAE 650-S <sup>3</sup>	3級アミン	ビニルポリマー	0.3M/0.5M	0.1-0.3M/0.5-0.6M	
DEAE Sepharose CL-6B <sup>4</sup>	3級アミン	アガロース	0.3M/0.5-0.6M		
QAE Glycophase <sup>2</sup>	4級アンモニウム	シリカガラス	0.5-0.6M/0.8M <sup>8</sup>	0.5M/0.7M	0.3M/0.7M
QMA Glycophase <sup>2</sup>	4級アンモニウム	シリカガラス	0.5-0.6M/0.8M <sup>9</sup>	0.5M/0.7M <sup>9</sup>	
QAE Sepharose CL-6B <sup>4</sup>	4級アンモニウム	アガロース	0.5-0.7M/10.M		

<sup>1</sup> Bio-Rad Chemical Division, Richmond, CA

<sup>2</sup> Pierce Chemical Company, Rockford, IL 61105

<sup>3</sup> Toyo Soda Mfg. Co., Ltd., Yamaguchi, Japan

<sup>4</sup> Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden

<sup>5</sup> E. coli 2本鎖DNAで決定。

<sup>6</sup> 1本鎖リボソームRNAで決定。

<sup>7</sup> 2本鎖ロトウイルスDNAで決定。

<sup>8</sup> 溶離液はまたメタノール17%を含んでいた。

<sup>9</sup> 溶離液はまたメタノール10%を含んでいた。

上の表において、結合塩化物モル濃度はまた、好適な洗浄モル濃度でもある。これらの結合／洗浄モル濃度は実質的に全ての目的とする DNA または RNA が結合するモル濃度であるが、これは、核酸が溶出し始めるモル濃度に近いモル濃度である。完全な結合と溶出開始との間の差は、少なくとも塩化物が 0.1M の点であり、そして通常、約 0.1M と 0.3M の間である。表に示す完全溶出のモル濃度は、溶出が開始される最低のモル濃度より実質的に高く、核酸の完全な溶出が起きる最低のモル濃度を包含する。ここに示すよりも高い溶出モル濃度も採用され得る。しかし、0.1M から 0.2M を越える増加は他の吸着成分の溶出を引き起こし、最終産物の純度を低下させる。

陰イオン交換体の単一ベッドを分離に用いる場合には、4 級または 3 級アミン交換体が好適である。2 つのベッドを用いる場合、第 1 のベッドは 3 級アミン型のような弱塩基陰イオン交換体を含み、そして第 2 のベッドは強塩基 4 級アンモニウム交換体を含まねばならない。この 2 つのベッド

は分離した別々のカラムであっても、または両方のベッドを単一のカラム内に積層したものであってもよい。

2 つのベッドを使用する実施態様においては、第 1 のベッドの溶出に用いるモル濃度は、核酸が第 2 のベッドに完全に結合するモル濃度に対応し得る。例えば、上記の表を参照すると、“フラクトゲル” 3 級アミン吸着剤は、第 2 ベッドの QAE グリコフェーズ 4 級アンモニウム交換体と組み合わせて、第 1 ベッドとして用いられる。上記表に示されるように、dsDNA は“フラクトゲル”から 0.5M で溶出する。その濃度は、QAE 交換体の有効結合モル濃度である。第 1 のベッドに用いられる洗浄溶液は、第 2 のベッドに入り、第 1 のベッドに同定されない可溶性成分をそこに保持させ得る。

核酸の完全な溶出を確実にするために、有機溶媒を、溶離液に少量加えてもよい。この目的にはメタノールが好ましいが、他の低級アルコール（エタノール、プロパノール、およびイソプロパノールを包含する）も使用され得る。尿素またはホ

2 9

ルムアミドのような他の有機成分もさらに用いられ得る。表の脚注に示すように溶離液のあるものでは、メタノールが加えられるが、メタノールのそのような使用は必要に応じて行われる。しかし、それによりマトリックスの望ましくない結合性を減ずることにより、DNA または RNA のより完全な回収がなされ得る。

本発明の実施に用いられるカラムは小さいサイズと容量のものでよい。例えば、典型的にはベッド容量は約 0.1 から 1.0 cm<sup>3</sup> (cc) が用いられ得、カラムまたはカートリッジに含まれるベッドは内径が約 0.3 から 3 cm である。本発明を用いた市販品としては、小さくコンパクトなカートリッジが調製され得る。積層したベッド系を用いる場合には、各ベッドの容量は指示されているものと同じでよい。陰イオン交換体を溶液に懸濁させる回分操作もまた使用され得るが、溶出カラムが一般に速くかつより効果的である。本発明の特定の実施態様においては、重力による流れを良好にし、夾雑物の捕捉を最大にするために、樹脂のメッシュ

3 0

サイズと孔径サイズとを選択することにより、流出特性が最適化され得る。

結合のための上記塩化ナトリウム水溶液は、好ましくは中性附近の pH を有する。つまり強塩基性でも酸性でもない。例えば、既知の緩衝液を用いて、約 5 から 9 の範囲の pH としたものを使用することができる。しかし、ある実施態様（例えば、DEAE 樹脂に有効な pH 勾配に必要とされるような場合）においては、よりアルカリ性または酸性の pH が用いられ得る。

本発明の方法に用いる試料を調製し得る生物材料には、細菌培養物、ウイルスに感染した細胞、単離ウイルス、そして培養物、細胞系列、および細菌に汚染された食品を包含するが、これらに限定されない。本方法は特に病原体の診断のための臨床試料に対して設計されている。例えば、試料は大便、血液または血清、細菌に感染した尿、または他の排出物（例えば痰や傷の滲出液）から調製され得る。

試験試料は、細胞またはウイルスの核酸水溶液

3 1

3 2

を得るために細胞および／またはウイルスを溶解させるのに用いられる既知の操作により、調製され得る。そのような溶液は核酸および他の溶解細胞またはウイルスの水溶性成分を含有する。体液や、滲出液の場合、その試料は通常、酸性ムコ多糖類を含む。大便が試料の場合、存在する全核酸はさらに、患者が食べた肉または野菜細胞に由来する核酸および正常な腸内および大便の菌相に由来する核酸を含み得る。

粗製物質は水性懸濁液として調製され、または得られる。例えば、固体便は、試料をカラム材料にかけのに相当するイオン強度および／またはpHで、水溶液に懸濁させる。例えば、望ましいモル濃度にするために、塩化ナトリウムが水溶液中の物質に加えられる。ラウリル硫酸ナトリウムまたは溶解酵素剤のような、細胞またはウイルス溶解剤が加えられる。プロテインアーゼKのような溶解酵素が陰イオン、非イオン、または両性イオン界面活性剤と共に用いられても良い。DNA/RNAを保護するために、エチレンジアミンテトラ酢酸

(EDTA)のようなキレート剤が加えられてもよい。ヌクレアーゼおよび／または2価金属イオンによるDNA/RNAの分解が阻止される。制御された温度(20~70℃)において短時間(5~60分間)インキュベートするのをもた、有効である。溶解後、固体成分は遠心分離または濾過により除去される。上清を本発明の方法に用いる試料に供する。必要に応じて、試料のpHはより中性のpHに調整される。イオン強度を上げるために塩が、またはイオン強度を下げるために水が加えられ得る。

試料を血液から調製する場合には、抗凝固剤が加えられねばならない。DNA/RNAが分離するのを保護するために用いられるEDTAはまた、抗凝固能を有する。酸性ムコ多糖類であり、そのように夾雑物のバックグラウンドに寄与し得るヘパリンの添加が好ましい。

尿から試料を調製する場合には、尿中の細菌細胞をまず遠心分離(ペレット化)により集め、次に溶菌剤中に懸濁させる。

培養細胞は、平板プレートまたは培養液から集

## 3 3

められる。細胞がグリセロールまたはジメチルスルホキシド(DMSO)中に存在する場合には、これら試薬を除くために細胞が洗浄される。ペレット化した細胞を再懸濁し、尿中の細菌細胞について述べたように処理が行われる。

ウイルス感染細胞については、ウイルスは通常細胞内に存在する。細胞を溶解すると、ウイルスは遊離する。ウイルスDNA/RNAは適当な既知の条件により遊離される。試料調製のための添加物および処理は特に但書のない限り上記のとおりである。溶解終了後、固体を除き、上澄を得る。

陰イオン交換体は使用時の形で供給されるか、または塩の水溶液をそれに通すことにより所望の形に変えられ得る。例えば、カラム内で、ベッドまたは樹脂を塩化物形に変えるために、NaCl溶液を使用することができる。あるいは、カラムにつめる前に交換体NaCl溶液に浸漬するか、もしくはHClおよびNaOHを用いる既知の方法を繰り返すこともできる。

カラム(または連結したカラム)を調製後、清

## 3 4

透な、固形物を含まない試料がカラムに添加される。重力を利用した流出系を用いる場合には、または好ましくは、試料はカラム上に注がれる。添加された試料は結合/洗浄工程に用いるよりも低いNaClモル濃度(例えば0.1M NaCl)である。試料は、上記のように、核酸が溶出し始めるイオン強度および／またはpHのNaCl水溶液で、カラム内へ洗い込まれる。洗浄容量は、結合しにくい成分をカラムから洗い出すのに充分でなければならない。通常1から5カラム容量で洗浄すれば充分である。

洗浄液は単一ベッドを用いる場合、および第2ベッドを用いる場合にも、廃棄される。しかし、好ましくは、第2ベッドを用いる場合には、洗浄液は第2ベッドを通過する。

結合した核酸はカラムまたは第1ベッドにイオン強度の高い溶離水溶液を通すことにより溶出する。上記水溶液は、核酸が完全に溶出するような最低条件に相当する、好ましくはより高い塩化物モル濃度の水溶液である。溶離液は、その充分な量が流され、カラムまたは第1ベッドから核酸が

## 3 5

## 3 6

除去される。通常、溶離液はカラム容量の約1から5容量が必要である。単一のベッドを使用する実施態様においては、核酸は溶離液中に回収される。しかし、その溶離液は、例えば、核酸沈澱試薬を加えることにより、さらに処理され得る。

2つの分離されたベッドまたは1本のカラムに積層したベッドを用いる場合には、第1ベッドからの溶離液は第2ベッドを通過する。溶離液のイオン強度は、第2ベッドに有効に結合させるような条件の強度であり、そして核酸は第2のベッドに結合する。さらに水溶液を第2のベッドに、または第1および第2のベッドに引き続いて流し、非結合成分を洗い出すこともできる。この洗浄工程においては、通常約1から5カラム容量が十分な量である。

第2のベッドに吸着した核酸は、第1カラム溶離液よりも高い塩化物モル濃度を有する水性溶離液を積層カラムまたは分離カラムの第2のベッドに通すことにより、溶出する。上記の、より高いモル濃度は、好ましくは、核酸が第2のベッドか

ら完全に溶出するときの最低の塩化物モル濃度に相当する。この溶離液は、核酸をカラムから除去するのに十分な容量だけカラムまたは第2ベッドを通過する。

特に、2本鎖DNAのような目的とする核酸を含む試料が、カルボキシル化ムコ多糖類および硫酸エステル化ムコ多糖類を、他の水溶性成分（溶解細胞またはウイルス水溶性成分）と共に含む実施態様においては、分別し得る塩化物モル濃度を用いることにより、目的の核酸を酸性ムコ多糖類のいずれかもしくは両者から分離し得る。実質的にすべての核酸がカラム材料に結合する塩化物モル濃度で試料をカラムにかけた後、そのカラムを臨界的な塩化物モル濃度で洗浄することにより、カルボキシル化ムコ多糖類が分離される。洗浄液として、核酸がカラム材料に結合して残留する塩化物モル濃度の塩化物水溶液を用い、そして、該核酸が溶出し始める最低の塩化物モル濃度に近いモル濃度を選択することにより、カラムは、充分な量の洗浄液で洗浄され得、比較的弱く結合してい

37

る成分（特に、カルボキシル化ムコ多糖類を包含する）が除去される。この方法の次の工程においては、結合している核酸は、該核酸が溶出する最低の塩化物モル濃度に相当する塩化物モル濃度を有する塩化物の水溶液をカラムに通すことにより、選択的に溶出する。この溶離液は、次に、充分な量でカラム内に流され、核酸がカラムから除去される。他方、硫酸エステル化ムコ多糖類はカラム内に残留する。ここで得られたこの回収溶出核酸は、実質的にムコ多糖類を含まない。

本発明の方法は、さらに、本発明を実施するのに対して現在のところ好ましい様式である、次の代表的な実施例により示される。

（以下余白）

38

#### （実施例）

本発明の方法は、以下の実施例によってさらに例証されるが、これら実施例は本発明の好ましい実施態様である。

#### 実施例 I

#### 強塩基陰イオン交換体を用いた糞便からの DNA 分離および精製

##### 1. 試料の調製：

(a) 約 8.0 ml の 0.5M NaCl/0.02M Na<sub>2</sub>EDTA を含む封入管に、約 1.0 g の大便（好ましくは新鮮なものであるが、核酸の分解を防ぐために冷蔵されるかまたは冷凍されたものでもよい）を加える。この封入管には、激しく振盪する場合に固い健康型の大便中の大きな線維状塊状物を粉碎するのに役立つ少量の不活性な弾丸（projectile）を含有させてもよい。（下痢の大便は、通常、微生物を NaCl/EDTA 溶液中に懸濁するために、このような激しい振盪工程を必要としない）。

上記試験管は、塊状物を粉碎する必要があるので、手で 3～8 分間激しく振盪する。次いで、大

39

40

きな破片を穏やかに遠心分離することによってペレット化する（臨床用遠心分離機を用いて低速度で5分間）。可溶性の上清が次の溶解の手順で用いられる。この上清は、懸濁した微生物、可溶性の夾雑物、および小さな粒子状の夾雑物を含有している。

(b)各カラムに対して、500  $\mu$  l の試料を以下のものに添加する：

750  $\mu$  l のプロテイナーゼ K（濃度10mg/ml）；

100  $\mu$  l の20% SDS；および

150  $\mu$  l の8M 尿素。

最終容量=1.5ml

最終濃度=0.013M NaCl

0.05M Na<sub>2</sub>EDTA

5 mg/ml プロテイナーゼ K

1.3% SDS

0.8M 尿素

そして大便の成分および塩類。

この試料を今度は、水浴中で中程度に攪拌しながら15~20分間、50~60℃に加熱する。

4 1

で平衡化した。こうして、このカラムは試料を適用する準備がなされた。このカラムは乾燥させてはならない。（本実施例および以下の実施例におけるすべての溶液のモル濃度は、特に断らない限り、水溶液について言及している。）

### 3. 精製の手順：

(a)調製された試料(3.0ml)を上記のカラムにゆっくりと注入し、場合によっては重力によって、あるいは栓をしたシリンジを用いて手動で穏やかに圧力を印加することによって流す。

(b)このカラムを今度は、5カラム容量の水性洗浄溶液(0.5M NaCl；17% MeOH，この洗浄に先立って0.5M NaCl だけによる洗浄を行い得る)で洗浄する。ポリカルボキシル化ムコ多糖類およびタンパクは、このようにしてカラムから洗い流されるが、DNA/RNA はカラムに結合したままである。硫酸エステル化ムコ多糖類もカラムに残留している。

(c)核酸(DNA)は、9 ml の水性 0.8M NaCl，17% MeOHで溶離し、0.5mlずつの画分を採集して分析

この試料を取り出し、1.5mlの脱イオン水を用いて1：2に希釈する。大便の溶液自身は自然に緩衝された溶液であり、従って付加的な緩衝液は用いられていない。典型的には、pHは6.5~7.5の範囲を維持している。

### 2. カラムの調製：

(a)表Aに示された第4アンモニウム陰イオン交換体（ビアースQAE グリコフェーズガラス；75~125  $\mu$  m の不規則粒子，小孔サイズ 200Å）を乾燥したまま、0.1M NaCl を含むフラスコに加える。真空ポンプまたはアスピレーターを用いて10~15分間脱ガスする。次いで、これを0.7cm×10cmのカラムに充填し、ベッド容積を3.0mlとした。振動を加えることによって充填を容易にした。

(b)マトリックスが塩化物の形に変換されることを確実にするために、このカラムに15mlの2.0M NaCl，次いで6.0mlのH<sub>2</sub>O，15mlの洗浄溶液（0.5M NaCl 17% MeOH），および15mlの溶離溶液（0.8M NaCl 17% MeOH）を通過させ、次いで6 ml のH<sub>2</sub>O ですすぎ、そして0.5M NaCl 17% MeOH(9 ml)

4 2

した。得られた核酸は、要求されるいかなる目的にも直接用い得る程度のものである。硫酸エステル化ムコ多糖類は、カラムに結合したままである。このようにして得られたDNA/RNA は、実質的に酸ムコ多糖類を含まない。

### 4. 分析：

純度および濃度に関する典型的な核酸の分析は、分光光度計による走査(210nm→300nm)，260nm/280nmにおける吸光度比の比較，および230nm/260nmにおける吸光度比の比較を包含する。アガロースゲル電気泳動によってDNAの状態（完全な状態）が測定され、ステイナーオールを用いた染色は、タンパクおよび酸ムコ多糖類からの精製を確認する助けとなる。蛍光スキャンを用いて夾雑物の蛍光を検出し得る。また、DNAのハイブリダイゼーション試験を行うことによって、採集されたDNAの完全な目的領域が存在することを決定し得る。

### 5. 結果：

これらの手順によって、有意な量の核酸が糞便から単離され、そして精製される。単離された核

4 3

4 4

酸の80%を越える部分は、全容量が1.0~2.0 mlの溶液中に濃縮されて見出し得る。

## 実施例Ⅱ

### 弱塩基陰イオン交換体を用いた糞便からのDNA単離および精製

#### 1. 試料の調製:

糞便試料は、実施例Ⅰに記述したように調製する。

#### 2. カラムの調製:

表Aに示された第3アミン陰イオン交換体(TSKフラクトゲル DEAE-650 S)を用いる。該陰イオン交換体は、予め膨潤され、20~50  $\mu$ mの粒子とされている。0.1M NaClを含むフラスコに、この樹脂の濃縮量を添加する。真空ポンプまたはアスピレーターを用いて10~15分間脱ガスし、次いで0.7 cm  $\times$  4 cmのカラムに充填し、ベッド容量を1.0 mlとした。これらの球状粒子の充填は、重力による沈降によって達成され得る(他方、実施例Ⅰの不規則なガラス粒子は、良好で稠密な一定のベッドを用意するために、トラップを行いおよび/また

は穏やかな振動を加える必要がある)。

(b)次に、このカラムは、必要に応じて、5カラム容量の2.0M NaClを通過させ、次いで3カラム容量(3 ml)のH<sub>2</sub>Oですすぎ、そして3カラム容量(3 ml)の0.3M NaClで平衡化することによって、塩化物の対イオンの形に変換する。こうして、このカラムは試料を適用する準備がなされた。このカラムは乾燥させてはならない。

#### 3. 精製の手順:

(a)調製された糞便試料(実施例Ⅰ, 1. aおよびbを参照; 全容量3.0 ml)を上記のカラムにゆっくりと注入し、重力によって、あるいは栓をしたシリンジを用いて手で穏やかに圧力を印加することによって流す。

(b)このカラムを今度は、15カラム容量(15 ml)の0.3M NaClで洗浄する。ポリカルボキシル化ムコ多糖類はカラムから洗い流されるが、DNA/RNAはカラムに結合したままである。

(c)次いで、このカラムを3カラム容量(3 ml)の0.5M NaClで溶離する。画分を採集すると、通

4 5

常、80%を越える量の回収された核酸が約1.0 mlの容量中に見出し得る。溶出したDNAは、要求されるいかなる目的にも直接用い得る程度のものである。硫酸エステル化ムコ多糖類はカラムに結合したままである。

#### 4. 分析:

分析は実施例Ⅰ, 4と同様である。DNA/RNAは、実質的に酸ムコ多糖類を含まずに得られる。

## 実施例Ⅲ

### 弱塩基および強塩基陰イオン交換体の両方を含む積層カラム系を用いた糞便からのDNA単離および精製

#### 1. 試料の調製:

試料の調製は、実施例Ⅰ, 1. aおよびbの記述と同様である。

#### 2. カラムの調製:

使用した第3アミンおよび第4アンモニウム交換体は、実施例ⅠおよびⅡに記述したものと同様である。この調製は、実施例Ⅰ 2. a)および実施例Ⅱ 2. a)と実質的に同様である。強塩基ガラス

4 6

交換体をまず0.7 cm  $\times$  10 cmのカラムに入れ、振動を加えて2.0 mlの容積高さまで充填する。次いで、ポリエチレンのカラムディスクをベッドの上部に載せ、さらに弱塩基フラクトゲルを重力によって1.0 mlのベッド高さまで充填する(全カラム容積は3.0 ml)。

(b)5.0カラム容量(15 ml)の0.2M NaClを、この複合カラムに通過させてイオン交換を行う。次いで、6 ml H<sub>2</sub>O, 5.0カラム容量(15 ml)の0.5M NaCl 17% MeOH, および15 mlの0.8M NaCl 17% MeOH, さらに6 ml H<sub>2</sub>Oを通過させ、そして最後に9 ml(3容量)の0.3M NaClで平衡化する。こうして、このカラムは使用する準備がなされた。

#### 3. 精製の手順:

試料を注入した後、このカラムを5カラム容量(15 ml)の水性0.3M NaClで洗浄すること以外は、実施例ⅠおよびⅡと同様の手順である。核酸は、今度は上方の弱塩基カラム(フラクトゲル)に結合する。DNAは、今度は5.0カラム容量(15 ml)の0.5M NaCl, 17% MeOHを用いることにより、

4 7

4 8

上方のカラムから下方のカラム（強塩基グリコフェーズガラス）に溶離する。この溶離液は、下方のカラムを洗浄する役目も果たす。最後に、DNA/RNAは、3.0カラム容量(9.0ml)の0.8M NaCl 17% Mooreを用いて下方のカラムから溶離する。画分の分析によって、核酸が1.0~2.0 mlの容積中に濃縮されていることが確認されるはずである。核酸の回収率が向上し、純度も実施例IおよびIIより高い。実施例IV

#### 全血試料に含まれる核酸の単離および精製

##### 1. 試料の調製:

(a)抗凝血剤EDTA(K<sub>2</sub>) (最終濃度25mM)を含む血液採集バイアルに新鮮血を採取する。次いで、以下の混合物を調製する:

250  $\mu$  l の血液溶液

250  $\mu$  l の 0.1 $\times$  SSC (=15mM NaCl 1.5mM クエン酸ナトリウム)

500  $\mu$  l のプロテイナーゼK (濃度10mg/ml)

100  $\mu$  l の 1% SDS

1,100  $\mu$  l 合計

4 9

含有する成分を単離し、その後で本発明の方法を利用し得る。例えば、デュボンアイソレーター10マイクロバイアルチューブを用いて、細菌をペレット化し得る。酸ムコ多糖類を実質的に含まない精製されたRNA/DNAが得られる。

#### 実施例V

##### 感染尿試料からの核酸単離および精製

##### 1. 試料の調製:

(a)感染した尿は細胞培養液として考え得る。好ましい方法は、まず細胞を遠心分離によって採集することであり、これより非常に濃縮され、多量の夾雑物を取り除かれる。次いで、これら細胞を懸濁させ、そして典型的な細胞培養物の溶解のように溶解させ得る。例えば、ペレット化された細胞を、160  $\mu$  l の0.25M Na<sub>2</sub>EDTA, 80  $\mu$  l の1.0% SDS, および 250  $\mu$  l のプロテイナーゼK (濃度10mg/ml)を含む 500  $\mu$  l の 0.3M NaCl中に懸濁させ得る。次いで、この溶液を湯浴中で50℃に10~20分間加熱する。

(b)必要に応じて、最初に細胞をペレット化して

(b)この溶液を中程度に穏やかに攪拌しながら、50℃にて10~20分間インキュベートする。この混合物は清浄となり、澄んだ濃褐色になる。

##### 2. カラムの調製:

カラムの調製は、実施例I, IIまたはIIIの記述と同様であり得る。

##### 3. 精製の手順:

精製の手順は、実施例I, IIまたはIIIの記述と同様であり得る。

##### 4. 分析:

分析の手順は、実施例Iの記述と同様であり得る。

##### 5. 結果:

このように全血をスクリーニングすることによって、血球、および血球の内側または外側のいずれかの病原体（存在すれば）から核酸が採取される。目的の核酸が、単に細胞内に存在するか、あるいは細胞外、すなわち被膜形成リンパ球の外側に存在することが知られている場合には、適当な血液分別技術を用いて、まずこれら目的の核酸を

5 0

濃縮することなく、全尿をスクリーニングすること可能である。単に、250  $\mu$  l の 0.3M NaCl 0.2M Na<sub>2</sub>EDTA, 500  $\mu$  l プロテイナーゼK (濃度10mg/ml) および 100  $\mu$  l の 1% SDSを、250  $\mu$  l の尿に添加して、この溶液を50℃にて10~20分間インキュベートする。

以後のすべての手順については、実施例I, IIおよび/またはIIIに与えられている。精製された核酸は、実質的に酸ムコ多糖類を含まずに得られる。

#### 実施例VI

##### 細胞/ウイルス一次溶解剤としてNaOHを用いた核酸(DNA)の単離および精製

##### 1. 試料の調製:

このNaOHによる手順は、上述の試料および他の試料のいずれに対しても行い得る。塩基性の条件ではRNAが分解されるので、NaOH溶解はDNAの採取に用いられるべきである。グリコフェーズQAEのようなガラスのカラムマトリックスは、塩基性の条件によって害を受ける。従って、NaOHによ

5 1

5 2

て溶解させた試料はカラムにかける前に中和すべきである。

典型的には、大便、尿、または血液を、NaCl、EDTA、およびNaOHに懸濁するかまたは混合して、それぞれ0.1Mおよび0.5Mの濃度にする。これにより、pHは、約13となって溶解が容易になる。室温で5～20分間インキュベートし、次いで500 $\mu$ lの0.5M トリスアセテートでpH8.0に中和する（最終容量1.0ml）。

以後の手順については 実施例 I、II および／または III に記述した通りである。

#### 実施例 VII

試料中に含まれる病原体の1次溶解剤として尿素または他のカオトロピック剤を用いた核酸の単離および精製

##### 1. 試料の調製：

この実施例は全く実施例 VI に従う。大便、尿、または他の試料が用いられ得る。簡単には、例えば尿から細胞を採取する。これらの細胞は、200 $\mu$ lの8M 尿素に懸濁して溶解させる。必要に応

じて、（50℃にて）5～20分間加熱することによって、この溶解を促進させ得る。澄んだ溶解物は、直ちに微小遠心して微粒子を除去し、次いで実施例 I～III のように調製したカラムに直接注入する。

以後の手順については、実施例 I、II および／または III に記述したとおりである。

上の実施例 I～V および VII に記述された条件は、特に DNA の単離と精製に関するものである。しかしながら、実施例 VI における NaOH 溶解の手順が RNA の単離には用いられないことを除けば、夾雑物を多く含んだ同種の生体試料から RNA を単離し精製するために、実質的に同様の手順を用い得る。最適な精製に用いられるべき正確な NaCl のモル濃度は、調整する必要があるが、これは容易に行い得る。適当な注入／洗浄／溶離のモル濃度は、本発明の原理に基づいて容易に決定し得る。

同様に、NaCl に代わる別のアルカリ金属の塩化物を塩化アンモニウムとして用いる場合、本発明の目的を達成するために必要なモル濃度は、最適な DNA/RNA の精製に必要なように予め決定し調整

5 3

し得る。

#### 実施例 VIII

E. coli の DNA を 0.2M NaCl に懸濁して、カラムに添加する。このカラムを少量の 0.3M 塩化ナトリウム、および 0.4M 塩化ナトリウムで洗浄する。これらの濃度では、DNA は溶離しない。0.5M NaCl を用いると、DNA が溶出する。NaCl を KCl に代えても、同じ溶出パターンが観察される。E. coli の DNA を 0.2M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  に懸濁しカラムに注入すると、やはり DNA は 0.5M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  で溶離する。

本発明の方法が発明の原理を依然として用いるように変更し得ることは当業者に明らかである。上述したように、陰イオン交換体カラム材料は、塩化物の形であり、そして吸着、洗浄および溶離に対して、次第に増加するモル濃度の塩化物を用いるのが好ましいが、他のハロゲン化物（例えば、臭化物またはヨウ化物）も使用し得る。例えば、ナトリウムまたはカリウムの臭化物またはヨウ化物は、塩化ナトリウムに対して述べたように使用し得る。この場合、カラムは塩と同じ陰イオンの形、

5 4

すなわち臭化物を用いる時は臭化物の形、ヨウ化物を用いる時はヨウ化物の形を用いる。

（発明の要約）

生体試料から核酸を単離し精製する本発明の方法は、陰イオン交換体材料、好ましくはこのような材料の塩化物形のものを用いて核酸を結合させる。次いで、次第にモル濃度を上昇させたハロゲン化物、好ましくは塩化物を用いて、核酸を吸着させ、洗浄し、そして溶出させる。

以 上

代理人 弁理士 山本秀策

5 5

5 6



手続補正書（自発）

昭和62年12月7日

特許庁長官殿

1. 事件の表示 62-304407

昭和62年12月1日出願の特許願

2. 発明の名称

生体試料から核酸を単離し精製する方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121

サンディエゴ, パーネス キャニオン

ロード 10030

名称 モレキュラー バイオシステムズ

インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒530 大阪府大阪市北区西天満

6丁目1番2号 千代田ビル別館4階

氏名 (7828) 弁理士 山本秀策

電話(大阪) 06-361-1139



方 式 在 籍



5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

明細書第50頁3行目の「…… 澄んだ濃褐色になる。」の後に、「高速遠心分離機（エッペンドルフ微小遠心機）は、微粒子状のものをベレット化させるのに役立つ。こうして、この可溶性の上清は、カラムにかけの準備がなされた。」を追加する。